



REVISIONES

El hueso como matriz para análisis toxicológico forense. BONE AS A MATRIX FOR FORENSIC TOXICOLOGICAL ANALYSIS.

Morillas Fernández ML¹, Sepúlveda Pérez JA²; Font Valsecchi G³,
Morillas Fernández D⁴, Morillas Fernández A⁵

1 Médico Forense. Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cataluña.

2 Médico. CIME-Centro Integral de Medicina. La Paz. Bolivia.

3 Médico Forense. Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cataluña.

4 Historiador. The Reach Free School, Reino Unido.

5 Profesora. mf Arquitectura Academy

RESUMEN: Cuando existe limitación para la obtención de muestras, el hueso puede ser útil en el análisis toxicológico post mortem, para determinar el posible consumo de xenobióticos y su relevancia en el momento de la muerte. Se estima que la idoneidad para análisis toxicológico puede ser hasta de 5 años. El objetivo del presente trabajo ha sido revisar las publicaciones existentes (PubMed) hasta el momento en el análisis de MO en toxicología forense. Los resultados nos muestran que no se han propuesto procedimientos estandarizados sobre la recolección y almacenamiento de MO. También se han empleado diferentes procedimientos para la preparación de la misma. Varias técnicas de análisis resultan adecuadas. La separación cromatográfica se utiliza en la mayoría de los casos. Se asume que los xenobióticos pueden ser detectados en MO, porque cualquier sustancia que circula en sangre puede estar en MO, aunque no hay datos exactos que demuestren que las muestras de MO son representativas de los niveles en sangre en el momento de la muerte. La distribución post mortem de una droga no parece ser uniforme, incluso topográficamente. Además, el lugar del muestreo, la edad, el ratio agua/grasa de la MO, las propiedades físico químicas de la molécula y la estabilidad de la MO en el intervalo post mortem pueden interferir en las concentraciones. La interpretación de los resultados es difícil por falta de datos bibliográficos, además de que existen limitaciones en la medición de determinadas sustancias y se requieren herramientas de investigación apropiadas. En conclusión, consideramos que la MO humana tiene un gran interés potencial como matriz y resulta razonable su elección en toxicología forense. Es evidente la necesidad de contar con más estudios validados para poder establecer una determinación cualitativa y cuantitativa de utilidad.

PALABRAS CLAVE: Médula ósea, hueso, toxicología forense, drogas, post-mortem.

ABSTRACT: When there is a limitation for obtaining samples, the bone may be useful for post-mortem toxicological analysis to determine the possible consumption of xenobiotics and their relevance at the time of death. BM has been found suitable for toxicological analysis up to 5 years after death. The purpose of the present work has been to review of the published data (PubMed) on BM analysis up to now on BM analysis in forensic toxicology. The results show us that no standardized procedures on the collection and storage of BM have been proposed. The collection method is different from some jobs with respect to others too. Different procedures were used for the preparation of the sample. Several analysis techniques are adequate. Chromatographic separation is used in most cases. It is assumed that xenobiotics can be detected in BM, because any substance that circulates in blood can be in BM. There are no exact data to show that BM samples are representative of blood levels at the time of death. The post-mortem distribution of a drug does not appear to be uniform, even topographically. In addition, the sample location, age, BM lipid/water ratio, physicochemical properties of the molecule can interfere in BM concentrations. The interpretation of the results is difficult due to lack of bibliographic data, in addition there are limitations of medication measurements and appropriate research tools are required. In conclusion, we consider that human BM has a great potential interest as a matrix and its choice in forensic toxicology is reasonable. The need for more validated studies is evident in order to establish a qualitative and quantitative determination of utility.

KEY WORDS: Bone marrow, bone, forensic toxicology, drugs, post mortem.

CONTACTO: María Laura Morillas Fernández. Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cataluña. Ciutat de la Justicia. Edificio G. Gran Via de Les Corts Catalanes, 111. 08075. Barcelona. España. laura_med81@yahoo.es

1. INTRODUCCIÓN.

Aunque la sangre es el medio de referencia en el campo de la toxicología analítica post mortem, el uso de otras matrices biológicas se ha descrito durante décadas en casos de

muestras de sangre limitadas, no disponibles o inutilizables. El tejido óseo puede ser una fuente de información toxicológica [1], así como lo puede ser la médula ósea (MO)[2].

El hueso está compuesto de una porción compacta, otra esponjosa y la médula ósea (Fig.1 y 2 [3]). La parte compacta se encuentra donde el esqueleto está sujeto a estrés físico en una dirección limitada, como los huesos largos. Por el contrario, al hueso esponjoso lo vemos donde se ejerce menos estrés o en las articulaciones. Este es más liviano que el compacto. La médula ósea se encuentra en las cavidades centrales de los huesos. Puede ser amarilla (Fig. 1 y 2) o roja

(Fig. 2); la primera se compone de tejido cicatricial, vasos sanguíneos y tejido adiposo y la segunda de tejido conectivo, células hematopoyéticas, glóbulos blancos y vasos sanguíneos. Los huesos largos reciben un abundante suministro local de sangre mientras que en los cortos, planos e irregulares el suministro es más limitado y a través del periostio [4].

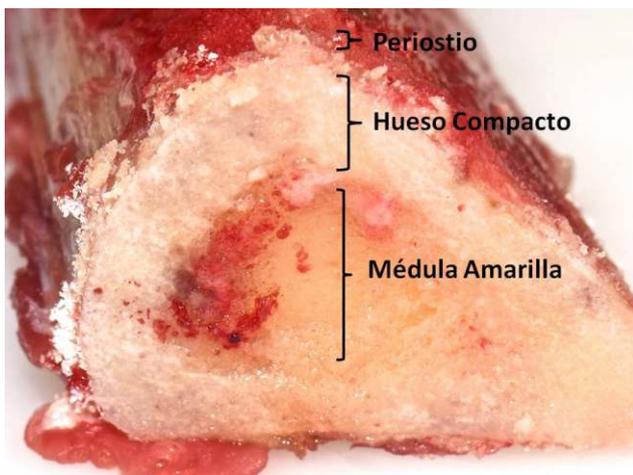


Figura 1

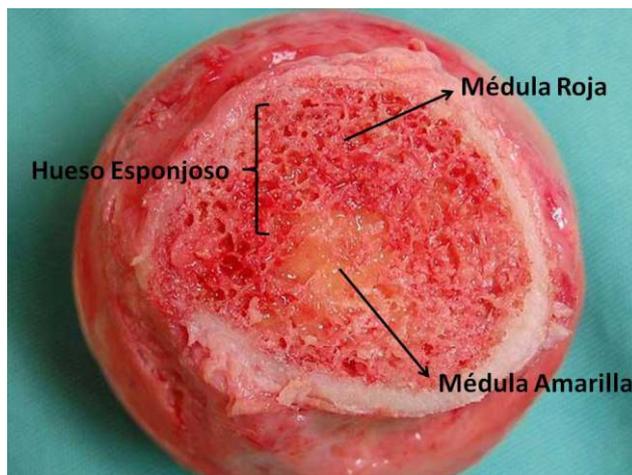


Figura 2

Del peso total de un cuerpo, la médula ósea constituye aproximadamente el 4% del peso corporal total, aproximadamente 3 kg en el hombre y 2,6 kg en la mujer [5,6]. La calidad de la médula ósea, junto con la densidad mineral del hueso, afectan a la fortaleza ósea [5].

Muy conocido es el papel de la MO en análisis genéticos, ya que proporciona una valiosa fuente de ADN y ARN, debido al hecho de que permanece sin descomponer y está disponible para análisis mucho más tiempo que cualquier otro tejido. Además, la influencia minimizada de productos de descomposición del cuerpo que podrían contaminar el material en MO es otro factor importante en el mantenimiento de la calidad adecuada de esta matriz [7].

La MO puede actuar como un repositorio para drogas, en virtud de su rica vascularización, su elevado nivel de lípidos y una protección ósea contra la contaminación, que hacen que sea potencialmente adecuada para toxicología forense [2]. Sin embargo, no se usa comúnmente debido a datos insuficientes sobre su farmacocinética, así como la ausencia de conocimiento sobre si las concentraciones de drogas encontradas en la médula representan los niveles en sangre en el momento de la muerte. También hay que tener en cuenta que en la MO humana se acumulan comúnmente sustancias usadas y de abuso, existiendo dificultad para obtener muestras libres de drogas [8].

Además, muestras de sangre y otros fluidos corporales son útiles para investigar la distribución antemortem y la interferencia debido a la redistribución/difusión, degradación, producción incidental y contaminación, dependiendo de las rutas de admisión y las propiedades del individuo de los productos químicos [9].

Debido al recubrimiento del hueso, existe una barrera física natural [4,10] que protege a la MO de la exposición a factores contaminantes exógenos tales como las sustancias contenidas en el suelo o productos procedentes de la putrefacción, así como de la actividad destructiva post mortem de hongos, bacterias, animales y plantas [10]. Y también tras intervención médica [11]. También por este motivo la putrefacción está retrasada, a pesar de la rica vascularización del hueso [4]. Una vez que el hueso pierde su integridad, la MO queda expuesta a sustancias externas y por lo tanto ya no puede ser útil como matriz para análisis [12].

Los datos informados sugieren que la preservación estimada de la médula ósea (a nivel histológico) es de 3 meses [13], mientras que su idoneidad para el análisis toxicológico puede conservarse hasta 5 años [7].

Desde el punto de vista analítico, la MO es una compleja y heterogénea matriz cuya composición celular y química depende tanto del sitio de recopilación como de las

características individuales de la fuente de muestra. La acumulación de xenobióticos en este tejido también puede depender de contenido de agua y grasa. Por lo tanto, para utilizar la médula ósea como una matriz en análisis toxicológico forense de muestras recolectadas durante una autopsia, hay que tener en cuenta varios procesos que ocurren después de la muerte y que afectan a los xenobióticos presentes en ella [10,12]. Estos procesos incluyen la redistribución post mortem, transformación, degradación, evaporación y neoformación. Debido a la multitud y complejidad de estos fenómenos, la interpretación de los resultados analíticos puede ser difícil o incluso imposible. Esto explica por qué la médula ósea no es un material recogido de forma rutinaria [2,13]. Estos procesos pueden complicarse aún más por una variedad de factores, tales como las fluctuaciones de temperatura, exposición al agua, condiciones de enterramiento y presencia de basura[8].

Debemos tener en cuenta, también, algunos aspectos en relación con determinados cambios que puede sufrir la MO.

La proporción de los componentes grasos y celulares de la MO cambia con la edad en una conversión fisiológica de médula roja a amarilla. La transición ocurre en las primeras dos décadas de vida. El patrón adulto de distribución de médula generalmente se alcanza a la edad de 25 años, cuando la médula roja se localiza en el esqueleto axial (cráneo, columna vertebral, esternón, clavículas, escápulas, pelvis, costillas) y proximal (fémur y húmero). A partir de ese momento, la proporción de células grasas aumenta en el resto del esqueleto, a una velocidad que depende de los parámetros individuales y las condiciones médicas. Los estudios muestran un aumento en la fracción de grasa de alrededor del 7% por década. La médula hematopoyética ha disminuido alrededor de un 30% del total a los 80 años de edad. Además, otros eventos –benignos y malignos– pueden alterar la composición de la MO. En adultos normales la médula amarilla puede reconvertirse en médula roja para aumentar la producción de células sanguíneas, por ejemplo en caso de anemia hemolítica o ciertos procesos malignos. La reconversión se produce exactamente en la secuencia inversa a la inicial, y ocurre en huesos planos[2].

En las investigaciones médico-legales de la muerte, las muestras de rutina recolectadas en la autopsia para pruebas toxicológicas incluyen sangre (por lo general, de sitios periféricos), orina, bilis, humor vítreo, estómago o contenido gástrico, y menos comúnmente, tejidos tales como hígado, cerebro, bazo y pulmón. En casos de descomposición extensa, exanguinaciones o la fragmentación del cuerpo, sólo algunos tejidos pueden estar disponibles. Además, en casos de restos limitados, sólo podemos disponer de músculo, cabello o esqueleto[4,14]. En estas circunstancias,

el hueso puede ser útil en el análisis toxicológico.

A los efectos de las pruebas toxicológicas, una variedad de muestras de hueso se han recopilado como se detalla en la literatura. Las muestras se han elegido en función de la cantidad de médula ósea, la facilidad de acceso o la disponibilidad; así los análisis se han realizados con muestras procedentes de cresta ilíaca, vértebras, fémur, esternón y costillas. Los estudios se han llevado a cabo con todo el hueso, periostio de superficie, parte compacta o médula [4].

Sin embargo, falta literatura sobre cuál es la mejor muestra, si las sustancias más comunes investigadas en análisis toxicológico pueden ser detectadas en hueso y, si los niveles en este se correlacionan con las concentraciones en sangre en el momento de la muerte[4,8].

Desde el primer reporte de análisis toxicológico en médula ósea en 1943, numerosos datos toxicológicos han sido publicados sobre la determinación de xenobióticos y los esfuerzos para encontrar una correlación entre los niveles en sangre y en médula de fármacos en muestras humanas y animales obtenidos post mortem. Además, ha habido varios informes de casos relacionados con análisis toxicológico de MO procedente de restos esqueletizados. Los diversos informes y los estudios sobre este tema se resumieron en una extensa revisión de Cartiser et al. en 2011. Desde entonces, sólo se han publicado unos pocos nuevos hallazgos sobre determinación de varios xenobióticos, incluidas sustancias psicoactivas, en la médula ósea [8].

El objetivo principal del análisis toxicológico post mortem es determinar el posible consumo de xenobióticos por la víctima y su relevancia en la causa de la muerte. Alcanzar este objetivo cuando sólo la MO está disponible plantea dos tipos de preguntas: (1) ¿Se pueden detectar los xenobióticos en MO desde el punto de vista farmacocinético y analítico? (2) ¿Los niveles de drogas en muestras de MO son representativos de las concentraciones en sangre en el momento de la muerte, es decir, son los resultados en MO cuantitativamente interpretables? [2].

El objetivo del presente trabajo ha sido revisar las publicaciones existentes hasta el momento e intentar avanzar en las respuestas formuladas en su momento con los datos actuales.

2. MÉTODO.

Se ha realizado una revisión sistemática en PubMed utilizando los términos de búsqueda “médula ósea” y “hueso” combinado con “toxicología”, “forense”, “post

mortem”, “análisis”, “detección” y “droga/s”.

3. ANÁLISIS DE MÉDULA ÓSEA.

Recogida y almacenamiento de muestras.

Hasta el momento, no se han propuesto procedimientos estandarizados sobre la recolección y almacenamiento de MO [2].

Se han tomado muestras de diferentes ubicaciones, tanto de animales (ratón, rata y conejo más frecuentemente) como de huesos humano. Aunque los huesos de las extremidades inferiores parecen ser un sitio frecuente de toma de muestras de MO, sobre todo de fémur, también se han recogido de vértebras o costillas.

En algún caso, la muestra utilizada era muy limitada y no fue suficiente para su utilización con el método propuesto, por lo que se requirió MO de ternero para la optimización y validación del método. El análisis de las muestras mostró que la MO de ternero es similar a la MO humana en términos de contenido de lípidos [8].

El método de recolección también difiere de unos trabajos a otros: tras sección de la cortical del fémur, extracción mediante pinzas de las costillas, aspiración en cuerpos vertebrales [7], o utilización de astillas de hueso o hueso molido [1].

Por todo ello, las muestras resultantes presentan diferentes propiedades: la MO femoral es más grasa que la de costilla, mientras que los aspirados, que están en forma líquida, son ricos en células hematopoyéticas. Pocos trabajos consideraron la estabilidad durante el almacenamiento, como la estabilidad in vitro de algunos medicamentos a temperatura variable o la influencia de la naturaleza del contenedor (vidrio o polietileno) y el uso de conservantes en la conservación. Estas investigaciones mostraron que las muestras de MO deben analizarse lo antes posible debido a la variación de concentración durante el almacenamiento. En general, en relación a las muestras clásicas utilizadas en toxicología y sin datos sobre la estabilidad del fármaco, debe priorizarse el almacenamiento a baja temperatura. Los conservantes, como el fluoruro de sodio, deberían agregarse a ciertos medicamentos (por ejemplo, etanol) incluso si la homogeneización en MO grasa puede resultar difícil [2].

Preparación de muestras y extracción.

Diversos procesos con respecto a la preparación de la muestra han sido realizados, en relación con la composición heterogénea de los diferentes tipos de MO.

Así, se han utilizado procedimientos de liofilización, homogeneización, extracción, eliminación de lípidos [8] y disolución [2].

El proceso de liofilización se introdujo para investigar el contenido de agua dentro de los diferentes tipos de MO y eliminar esta variable, ya que podría afectar el proceso de extracción de diferentes maneras [8].

La eliminación de lípidos se puede conseguir con un lavado de hexano adicional del extracto final o por extracción en varios pasos como proponen otros autores. La extracción en fase sólida se aplicó con éxito en otros estudios [2].

Por lo general, muchos de los métodos de extracción informados (extracción con metanol, extracción de Soxhlet o digestión ácida) consumen mucho tiempo, típicamente entre 12-72 h de incubación. Claramente, el uso de métodos de extracción pasiva o digestión representa una limitación significativa en el rendimiento analítico. Un enfoque para acelerar este proceso es la extracción asistida por microondas (MAE) [1].

La disolución es necesaria para obtener un líquido homogéneo adecuado para una mayor extracción. Se han descrito varios métodos que involucran técnicas mecánicas (ultrasonidos u homogeneizador) o agitación, calefacción y maceración en el medio de extracción [2].

Métodos analíticos.

Son varias la técnicas que han resultado adecuadas y relevantes en el análisis de MO. En la mayoría de los casos, el análisis forense de MO utiliza enfoques cromatográficos similares a los de otras matrices. La separación cromatográfica se realiza principalmente por cromatografía de gases (GC) en lugar de cromatografía líquida (LC). Esto se puede explicar fácilmente por el hecho de que la espectrometría de masas (MS) es el sistema de detección de elección para el análisis toxicológico de la mayoría de matrices, y los sistemas GC/MS eran de uso más generalizado que los sistemas LC/MS hasta hace unos años; Recientemente, el tándem LC/MS también se ha aplicado en MO. Aunque la espectrometría de masas sigue siendo el principal sistema de detección, otros sistemas han sido utilizados, como el ionizador de llama para moléculas volátiles (por ejemplo, etanol, metanol, isopropanol). Varias publicaciones destacaron la idoneidad de la inmunología de

ensayo tanto para análisis cualitativo como cuantitativo [2].

El sistema MAE/UHPLC-MS-TOF (extracción asistida por microondas/cromatografía líquida de ultra-alta resolución con cromatografía de masas con analizador de tiempo de vuelo) ha sido demostrado útil en toxicología forense, especialmente en el screening para 31 sustancias psicoactivas en MO humana [8].

4. RESULTADOS.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se indican los principales hallazgos encontrados en las publicaciones, el lugar de toma de la muestra, los métodos pretratamiento de la misma y el tipo de análisis realizado, así como los resultados toxicológicos en médula ósea y sangre respectivamente.

Sustancia detectada Referencia y año	Especie Lugar de toma de la muestra	Pretratamiento de la muestra Análisis	Hallazgos analíticos
Acetaminofeno ² 1989	Humano --	MO macerada en agua, LLE (Acetona) LC/DAD	Reporte de 1 caso MO: acetaminofeno 0,5 µg/g Sg: --
Acetona ² 1982	Conejo Fémur	MO homogeneizada (ultrasonidos con baño de hielo), centrifugación GC/FID	Experimental MO: acetona 4,2-13,1 mg% Sg: acetona 10-45 mg%
Anfetamina Metanfetamina ² 1986	Humano Fémur	MO homogeneizada en acetona etílico, LLE, derivación TFA GD/MS	Experimental MO: anfetamina 0,1 µmol/100g, metanfetamina 1 µmol/100g Sg: --
Anfetamina Metanfetamina ² 1990	Humano Huesos de extremidades	Digestión en pH básico a 70°C, LLE (etil éter diclorometano), derivación TFA GC/MS	Experimental MO: metanfetamina 0,2-0,52 µmol/100 g interferencia con anfetamina Sg: metanfetamina 0,08-0,14 µmol/100g. Anfetamina 0,03-0,07 µmol/100g
Anfetamina Metanfetamina ² 2000	Humano --	-- GC/MS	Reporte de 1 caso MO: anfetamina + metanfetamina 0,54 µmol/100g Sg: anfetamina + metanfetamina 1,66 µmol/100g
Bromisovalum ² 1997	Humano Fémur	MO pulverizada y homogeneizada, LLE LC/MS	Reporte de 1 caso MO: 95,4 µg/g Sg: --
Bromisovalum ¹⁵ 1997	Humano Fémur	MO en polvo GC/MS	Caso sospechoso de ingestión MO: Bromisovalum en femur I 139,7 µg/g, femur D 36,4 µg/g Sg: --
Cafeína ¹⁶ 2010	Humano Fémur, 5ª costilla	MO aplastada con alicates, LLE GC-MS/MS	Concentración de cafeína en sg > en MO Ratio Sg/MO costilla: 1,44±0,41; sg/MO femoral: 2,46±0,71; sugiere que cafeína no se acumula en MO
Clofazimina ¹⁷ 2014	Rata Fémur, tibia	Lavado con PBS, congelación -20°C, LLE RP-HPLC-DAD	Experimental MO: 915,45 ng/ml Sg: 593,2 ng/ml
Colchicina ² 1992	Humano --	MO homogeneizada en buffer fosfato (homogeneizador) RIA	Caso sospechoso de ingestión MO: colchicina >600 ng/g Sg: --
Desipramina ² 1990	Conejo Fémur, tibia	MO homogeneizada en buffer salino (ultrasonido), LLE, eliminación de lípidos LC/DAD	Experimental MO: 0,745-3,764 µg/g Sg: 0,023-0,112 µ/ml
Dextropropoxifeno ² 1989	Humano --	MO macerada en agua, LLE LC/DAD	Reporte de 1 caso MO: 1,2 µg/g Sg: --
Diazepam ² 1991	Rata Fémur, tibia	Polvo en solución ácida, dilución con buffer fosfato LC/DAD	Experimental MO: 2-5 ng/g Sg: 0,2-7,5 ng/ml
Diazepam ² 2009	Rata Fémur	MO homogeneizada en solución salina (ultrasonidos) ELISA	Experimental MO: sensibilidad test de ELISA: 100% Sg: --
Diazepam, nordiazepam ¹⁸ 2013	Humano Fémur	Homogenización en agua desionizada, LLE UPLC/MS-MS	Reporte de 1 caso MO: presencia de diazepam y su metabolito primario nordiazepam Sg: --
Diazinon ² 2009	Conejo Pierna delantera y trasera	MO homogeneizada (homogeneizador), LLE, SPE GC/MS	Experimental MO: 13-118 mg/kg tras muerte, 36-3515 mg/kg después de 1 mes enterrado Sg: 0,1-0,8 mg/l tras muerte
Endosulfán ² 2009	Conejo Pierna delantera y trasera	MO homogeneizada en sulfato sódico (homeneizador), LLE GC/MS	Experimental MO: α-endosulfán: No detectado tras muerte, 0,02-0,3 mg/kg después de 1 mes enterrado β-endosulfán: No detectado tras muerte, 0,07-0,9 mg/kg después de 1 mes enterrado endosulfán éter: No detectado tras muerte, 0,02-0,2 mg/kg después de 1 mes enterrado endosulfán sulfato: 0,12-0,15 mg/kg tras muerte, no detectado después de 1 mes enterrado Sg: α-endosulfán: No detectado tras muerte β-endosulfán: No detectado tras muerte endosulfán éter: 0,01-0,02mg/kg tras muerte endosulfán sulfato: 0,15-2,77 mg/kg tras muerte

Etclorvinol ² 1981	Conejo Fémur, tibia	MO homogeneizada en agua, LLE GC/FID	Experimental MO: 0,17-79,90 mg% Sg: 0,11-3,32 mg%
Fentanilo ¹⁹ 2009	Rata Fémur	MO homogeneizada en solución salina (ultrasonidos), disolución en buffer acetato ELISA	Experimental MO: sensibilidad ELISA 66 a 100% Sg: --
Fentanilo ²⁰ 2010	Rata Fémur	MO homogeneizada en solución salina (ultrasonidos), dilución en buffer acetato ELISA	Experimental MO: sensibilidad ELIA 67 a 100% Sg: --
Flurazepam ² 1982	Conejo Fémur, tibia	MO homogeneizada en agua (ultrasonidos), LLE, remoción de lípidos GC/ECD	Experimental MO: 0,013-8,325 mg% Sg: 0,038-0,313 mg%
Isopropanolol ² 1982	Conejo Fémur	MO homogeneizadas (ultrasonidos en baño de hielo), centrifugación GC/FID	Experimental MO: 30,4-119,9 mg% Sg: 82-218 mg%
Ketamina ² 2008	Rata Fémur	MO homogeneizada en solución salina (ultrasonidos) ELISA, GC/ECD	Experimental MO: sensibilidad test ELISA 75 a 100% Sg: --
Ketamina ² 2008	Rata Fémur	MO homogeneizada en solución salina (ultrasonidos) ELISA, LC/MSMS	Experimental MO: sensibilidad test ELISA 100% Sg: --
Meprobamato ² 2007	Humano Fémur	MO homogeneizada en buffer amoníaco, LLE, remoción de lípidos (hexano/etanol/agua) GC/MS	Serie de autopsias humanas MO: 0-116 µg/g Sg: 0,41-372 µg/g
Metanol ² 1982	Conejo Fémur, tibia	MO homogeneizada (ultrasonidos en baño de hielo), centrifugación GC/FID	Experimental MO: metanol 24,4-108,3 mg% Sg: 67,5-255,7 mg%
Midazolam ² 2001	Ratón, rata --	MO homogeneizada en solución salina, centrifugación ELISA	Experimental MO: detectado Sg: detectado
Morfina ² 2001	Humano Fémur	MO homogeneizada en agua, LLE, derivación TMSA FPIA, GC-FID	Reporte de 1 caso MO: 195 ng/g Sg: --
Morfina ² 2006	Conejo Huesos largos	MO homogeneizada CEDIA	Experimental MO: 135-1080 ng/mg tras la muerte, 102-1108 ng/mg tras 1 semana enterrado, 0-592 ng/mg después de 2 semanas enterrado Sg: 106-2350 ng/ml tras la muerte Experimental: dosis letal única
Morfina, 6-AM ² 2007	Ratón --	MO homogeneizadas (homogenei- zador), LLE, derivación BSTFA GC/MS	Experimental: administración crónica MO: morfina no detectada; 6-AM no detectada Sg: morfina no detectada; 6-AM no detectada Experimental: dosis letal MO: morfina 34-220 ng/mg tras la muerte, no detectado después de 2 meses de conservación del hueso; 6-AM 2,4-24 ng/mg tras la muerte, 0,3-6,3 ng/mg después de 2 meses de conservación del hueso
Nortriptilina ² 1993	Conejo Fémur, tibia	MO homogeneizada en solución salina (ultrasonidos), LLE, remoción de lípidos (hexano/etanol/agua) LC/DAD	Experimental MO: 0,835-6,778 µg/g Sg: 0,036-0,227 µg/ml
Paraquat ² 1997	Conejo --	Mo homogeneizada en solución acida, SPE LC/DAD	Experimental MO: 1,5-43,3 µg/g después de 3 a 24 meses enterrado Sg: resultados en términos de ratio sg/mo
Pentobarbital ² 1985	Conejo Fémur	Mo homogeneizada (ultrasonidos), LLE GC/FID	Experimental dosis no letal MO: 2,29-3,70 mg% Sg: 2,26-3,20 mg% Experimental dosis letal MO: 4,3-6,68 mg% Sg: 4,66-5,69 mg%
Triazolam ² 1997	Humano Fémur	Digestión a pH básico con calor, LLE GC/MS-NICI	Reporte de 1 caso MO: víctima 1: 0,36 ng/g, víctima 2: 0,37 ng/g Sg: --
Veliparib ²⁰ 2010	Humano Células de MO y sobrenadante	Congelación-descongelación, dilución con acetonitrilo LC-MS-MS	Reporte de 1 caso MO: sobrenadante 39,7nM células 0,32 nmol/10 ⁶ cél. SG: 286 nM

MO Médula ósea, Sg sangre, BSTFA bi(trimetil-silyl)trifluoacetamida, CEDIA inmunoensayo con enzimas clonadas, DAD detector de arreglo de diodo, ECD detector de captura de electrones, ELISA ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, FID detector de ionización de llama, FPIA inmunoensayo de polarización fluorescente, GC cromatografía de gases, HPLC cromatografía líquida de alta eficacia, i.p. intraperitoneal, i.v. intravenoso, LC cromatografía líquida, LLE extracción líquido-líquido, MS espectrofotometría de masas, NICI ionización química con iones negativos, PBS buffer salino

TABLA 1: Adaptada y ampliada de N Cartiser et al.[2]

EL HUESO COMO MATRIZ PARA ANÁLISIS TOXICOLÓGICO FORENSE.

En la tabla 2 se describen los resultados de series de autopsias analizadas, atendiendo a los mismos parámetros.

Sustancia detectada Referencia y año	Especie Lugar de toma de la muestra	Pretratamiento de la muestra Análisis	Hallazgos analíticos
Benzodicepinas (diazepam, nordiazepam), opiáceos (codeína, 6-AM, hidrocodona, oxicodona, morfina), cocaína y metabolitos ⁴ 2009	Humano Cresta iliaca, vértebra	Técnicas de rutina GC/MS	Serie de autopsias humanas Hueso: Diazepam: 0,60-2,4 mg/kg Nordiazepam 0,32-1,60 mg/kg. Codeína: detectada en el 50% de los casos positivos en sg 6-AM y hidrocodona: no se detectaron en los casos + en sg Morfina: detectada sólo en 1 de los casos + en sg Cocaína: detectada en hueso en 1 de 3 positivos en sg 120ng/g Cocaetileno: detectado en 2 casos: 48 y 80ng/ml.
36 drogas (anfetaminas, codeinas, sedativas, MDZs, TCAs, anticonvulsivantes, anestésicos, analgésicos) ¹ 2013	Humano Vértebra	LLE, SPE GC/MS	Series de autopsias humanas Correlaciones entre sg cardiaca, líquido pericárdico y MO
Etanol, acetona, cianuro, tolueno, petróleo licuado, cresol, etileno, H ₂ S ⁴ 2013	Humano Vértebra torácica baja	Incubación, solución, centrifugación HS/GC/MS	Correlaciones entre sg, líquido pericárdico y MO
Meprobamato ²² 2013	Humano Fémur	Técnicas de rutina GC	Serie de autopsias humanas MO: 0,21-156,6 µg/g Sg: 0,41-464,4 µg/ml
Screening general desconocido ² 2005	Humano Fémur	Digestión enzimática con calor, LLE, remoción de lípidos (hexano/etanol/agua) GC/MS	Serie de autopsias humanas MO: acetaminofeno, amitriptilina, citalopram, ciamemazina, destropoxifeno, fluoxetina, meprobamato, norcobazam, nordiazepam, nortriptilina, oxacepam, pentobarbital, sertralina, tiopental, venlafaxina
Screening general desconocido ² 1989	Humano --	MO macerada en agua, acidificada; LLE GC/MS, GC/NPD, TLC, LC/DAD	Reporte de 1 caso MO: paracetamol: 0,5 µg/g, dextropropoxifeno: 1,2 µg/g
Screening general desconocido ² 1978	Humano Vértebra	MO calentada en etanol, acidificada, LLE GC/FID	Reporte de 1 caso MO: amitriptilina: 0,04mg/51,8g MO
Screening selectivo ² 2000	Humano: 1° estudio fémur 2° estudio lumbar	MO homogeneizada (ultrasonidos), métodos de rutina usados para análisis de drogas en sangre GC, LC	Serie de autopsias humanas MO: amitriptilina 0,56-6,3 mg/kg nortriptilina 0,2-5,4 mg/kg, doxepin 0,21-0,97 mg/kg, nordoxepin 0,84-0,86 mg/kg, sertralina 0,67 mg/kg, nordiazepam 0,16-1,9 mg/kg, temazepam 0,2-4,4 mg/kg, oxacepam 0,36-1,6 mg/kg, propoxifeno 0,75-25 mg/kg, metadona 0,56-0,86 mg/kg, oxicodona 1,20mg/kg, mianscrin 0,98 mg/kg, nordosepin 34 mg/kg, doxepin 2,9 mg/kg, sertralina 1,2 mg/kg, moclobemida 24 mg/kg, tioridazina 2,1-4,8 mg/kg, mesoridazina (metabolito) 1,3 mg/kg, olanzapina 0,98 mg/kg

MO Médula ósea, Sg sangre, BSTFA bi(trimetilsilyl)trifluoacetamida, CEDIA inmunoensayo con enzimas clonadas, DAD detector de arreglo de diodo, ECD detector de captura de electrones, ELISA ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, FID detector de ionización de llama, FPIA inmunoensayo de polarización fluorescente, GC cromatografía de gases, HPLC cromatografía líquida de alta eficacia, i.p. intraperitoneal, i.v. intravenoso, LC cromatografía líquida, LLE extracción líquido-líquido, MS espectrofotometría de masas, NICI ionización química con iones negativos, PBS buffer salino fosfato, RIA radioinmunoensayo, RP-HPLC cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa, SPE extracción en fase sólida, TFA ácido trifluoroacético, TMSA trimetilsilylacetamida, -- no disponible, D derecho, lizquierdo.

TABLA 2: Adaptada y ampliada de N Cartiser et al.[2]

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En el análisis toxicológico con intenciones forenses, la sangre es la matriz de uso principal tanto para la interpretación cualitativa como cuantitativa. La literatura nos muestra como en los últimos años se vienen utilizando otras sustancias con la intención de ampliar los recursos disponibles. El problema viene con el acceso limitado a las mismas en el caso de que se trate de restos esqueléticos, putrefacción, carbonización severa o fragmentos de cuerpos, como por ejemplo tras un accidente de avión. Así, la MO puede ser el único tejido disponible para la investigación toxicológica. Hemos visto que presenta varias ventajas, como ser uno de los tejidos más protegidos del cuerpo, frente a la contaminación o la misma putrefacción. También es importante la rica vascularización y el gran componente lipídico que tiene. Por ello, hemos revisado los estudios realizados hasta el momento bien sea con animales o con humanos en los que la matriz utilizada es MO.

Respecto a la primera pregunta planteada, si los xenobióticos pueden ser detectados en MO, debido a la rica vascularización de la MO se asume que cualquier sustancia que circula en sangre puede estar presente en MO[2]. En los casos referenciados, la mayoría de las sustancias investigadas han sido detectadas en MO. La interpretación de los casos negativos, debe realizarse con cautela, porque pueden entrar diversos factores en juego como el propio diseño del método utilizado.

Respecto a la segunda pregunta, si los niveles en muestras de MO son representativos de los niveles en sangre en el momento de la muerte, la bibliografía no da una respuesta contundente. A pesar de que los datos farmacocinéticos para MO son limitados, ocasionalmente se han descrito procesos específicos, como la acumulación de benzodiazepinas y fentanilo. Los mecanismos involucrados en la distribución de drogas en MO deberían, por lo tanto, investigarse en experimentos con animales. Una correlación entre concentraciones en sangre y MO ha sido demostrada para una amplia gama de compuestos, lo que permite la extrapolación de los resultados de MO a sangre, que son más fácilmente interpretables. Sin embargo, la aplicación de estos datos, en su mayoría obtenidos en modelos animales, para casos de autopsias humanas, sujeto a condiciones post mortem incontrolables y, a menudo, desconocidas, requiere un estudio adicional [2].

Otro aspecto a considerar para la interpretación cuantitativa son los cambios post mortem de la concentración en MO. Más allá de la estabilidad de la droga, se ha visto que la redistribución de algunos compuestos puede provocar tanto un aumento como una disminución en los niveles en MO [2]. Maeda et al. encontraron una gran diferencia de

concentraciones de Bromisovalum entre fémur derecho e izquierdo, lo que indicaba interferencia. El patrón de alteración post mortem de una droga o veneno contenido en MO no parece ser uniforme en un cuerpo, incluso topográficamente y es, por lo tanto, impredecible[15].

También, como resultado de la composición variable de la MO (es decir, grasa y celularidad) en diferentes huesos según la edad, el lugar de muestreo parece ser un factor relevante que debería ser investigado. Así como, el comportamiento hidrofílico o lipofílico de las moléculas debe tenerse en cuenta: Winek et al. demostraron que la correlación sangre/MO de compuestos solubles en agua, como metanol, etanol, isopropanol y acetona, se mejoró corrigiendo el contenido de agua, mientras que otros autores describieron la acumulación en MO de drogas lipofílicas como el diazepam[2].

La interpretación de los resultados analíticos en casos particulares parece ser una tarea difícil. Existe una clara falta de datos bibliográficos [1] y documentos científicos que estimen la potencial correlación entre los niveles de xenobióticos en sangre y en médula ósea y, que informen de los rangos que consiguen efectos terapéuticos, tóxicos o letales. Los resultados del análisis toxicológico de médula ósea pueden usarse como base para dilucidar unas conclusiones sólo si se interpretan junto con el análisis de otras muestras biológicas, incluidas la sangre, el humor vítreo u otros órganos internos [8].

Por otro lado, nuestro entendimiento de las implicaciones y limitaciones de las mediciones de medicamentos en este material sigue siendo pobre para permitir una interpretación fiable de los datos obtenidos. Se requieren herramientas de investigación apropiadas de preparación de muestras (que incluyen el paso esencial del aislamiento de la droga de la matriz) y ensayos analíticos validados que permitan la detección de drogas con la mayor sensibilidad posible y dentro de un corto periodo de tiempo [8].

En conclusión, como en estudios anteriores, consideramos que la MO humana tiene un gran interés potencial como matriz, por lo que resulta razonable su elección en toxicología forense. Es evidente la necesidad de contar con más estudios validados para poder establecer una determinación cualitativa y cuantitativa de utilidad.

Agradecimientos.

A Laia Rojas, por su buen hacer con la tecnología y presentación final de todos mis trabajos.

A Raúl Martín, por la revisión del trabajo y el apoyo incondicional.

A Celia Rudilla, por su inestimable ayuda en la búsqueda bibliográfica.

BIBLIOGRAFÍA.

1. NA. Desrosiers, CC. Betit, JH. Watterson. Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues. *Forensic Sci Int.* 2009 Jul 1;188(1-3):23-30.
2. N. Cartiser, F. Bevalot, L. Fanton, Y. Gaillard, J. Guitton. State-of-the-art of bone marrow analysis in forensic toxicology: a review, *Int. J. Legal Med.* 125 (2011) 181-198.
3. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Caput_femoris_cortex_medulla.jpg
4. KK. McGrath, AJ. Jenkins. Detection of drugs of forensic importance in postmortem bone. *Am J Forensic Med Pathol.* 2009 Mar;30(1):40-4.
5. J.S. Blebea, M. Houseni, D.A. Torigian, Ch. Fan, A. Mavi, Y. Zhuge, T. Iwanaga, S. Mishra, J. Udupa, J. Zhuang, R. Gopal, A. Alavi. Structural and functional imaging of normal bone marrow and evaluation of its age-related changes, *Semin. Nucl. Med.* 37 (2007) 185-194.
6. S. Hwang, D. Panicek. Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, part 1, *Skeletal Radiol.* 36 (2007) 913-920.
7. N.L. van Doorn, A.S. Wilson, E. Willerslev, T.P. Gilbert, Bone marrow and bone as a source for postmortem RNA, *J. Forensic Sci.* 56 (2011) 720-725.
8. R. Wietecha-Posluszny, S. Lendor, M. Garnysz, M. Zawadzki, P. Kóscielniak. Human bone marrow as a tissue in post-mortem identification and determination of psychoactive Substances-Screening methodology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017 Sep 1;1061-1062:459-467.
9. M. Tominaga, T. Ishikawa, T. Michiue, S. Oritani, I. Koide, Y. Kuramoto, M. Ogawa, H. Maeda. Postmortem analyses of gaseous and volatile substances in pericardial fluid and bone marrow aspirate. *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 147-151.
10. L.M. McIntyre, C.V. King, M. Boratto, O.H. Drummer. Postmortem drug analyses in bone and bone marrow, *Ther. Drug Monit.* 22 (2000) 79-83.
11. M. Tominaga, T. Michiue, T. Ishikawa, O. Kawamoto, S. Oritani K Ikeda, M. Ogawa, H. Maeda. Postmortem analyses of drugs in pericardial fluid and bone marrow aspirate. *J Anal. Toxicol.* 2013 Sep;37(7):423-9.
12. N.M. Lafreniere, J.H. Watterson. Detection of acute fentanyl exposure in fresh and decomposed skeletal tissues part II: the effect of dose-death interval, *Forensic Sci. Int.* 194 (2010) 60-66.
13. W. Grellner, F. Glenewinkel. Exhumations: synopsis of morphological and toxicological findings in relation to the postmortem interval. Survey on a 20-year period and review of the literature, *Forensic Sci. Int.* 90 (1997) 139-159.
14. L. Tattoli, M. Tsokos, J. Sautter, J. Anagnostopoulos, E. Maselli, G. Ingravallo, M. Delia, B. Solarino. Postmortem bone marrow analysis in forensic science: study of 73 cases and review of the literature, *Forensic Sci. Int.* 234 (2014) 72-78.
15. H. Maeda, S. Oritani, K. Nagai, T. Tanaka, N. Tanaka. Detection of bromisovalum from the bone marrow of skeletonized human remains: a case report with a comparison between gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). *Med Sci Law.* 1997 Jul;37(3):248-53.
16. N. Cartiser, F. Bévalot, C. Chatenayh, C. Le Meur, Y. Gaillard, D. Malicier, J. Guitton, L. Fanton. Postmortem measurement of caffeine in bone marrow: influence of sample location and correlation with blood concentration. *Forensic Sci. Int.* 2011 Jul 15;210(1-3):149-53.
17. CH. Srikanth, P. Joshi, AK. Bikkasani, K. porwal, JR. Gayen. Bone distribution study on anti leprotic drug clofazimine in rat bone marrow cells by a sensitive reverse phase liquid chromatography method. *J. Chromatogr. B* 960(2014)82-86.
18. T. Delabarde, C. Keyser, A. Tracqui, D. Charabidze, B. Ludes. The potential of forensic analysis on human bones found in riverine environment. *Forensic Sci. Int.* 228(2013)e1-e5.
19. N.M. Lafreniere, J.H. Watterson, Detection of acute fentanyl exposure in fresh and decomposed skeletal tissues part II: the effect of dose-death interval, *Forensic Sci. Int.* 194 (2010) 60-66.
20. S. Reinhardt, M. Zhao, A. Mnatsakanian, L. Xu, R.M. Ricklis, A. Chen, J.E. Karp, M.A. Rudek, A rapid and sensitive method for determination of veliparib (ABT-888) in human plasma, bone marrow cells and supernatant by using LC/MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 122-128.
21. F. Bévalot, MP. Gustin, N. Cartiser, Y. Gaillard, C. Le Meur, L. Fanton, J. Guitton, D. Malicier. Using bone marrow matrix to analyze meprobamate for forensic toxicological purposes. *Int. J. Legal Med.* (2013) Sep;127(5):915-21.